

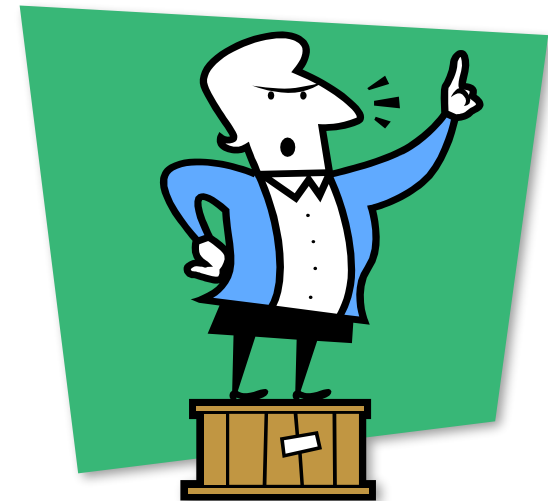
Thema der Vorlesung:

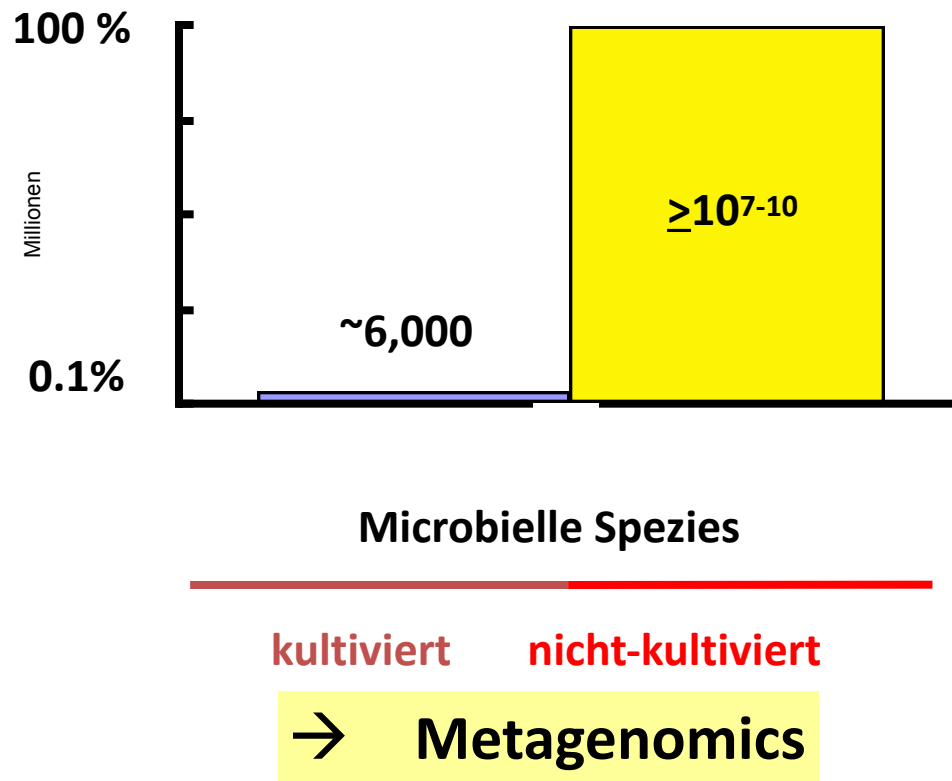
**Typisierung und Einteilung von
Mikroorganismen**

Klassisch, physiologisch

Molekulare Marker (16S rRNA etc.)

**Differenzierung zwischen
Bacteria/Archaea und Eukarya**





Aquatische Habitate	12	$\times 10^{28}$ Zellen
Ocean. <i>subsurfaces</i>	355	$\times 10^{28}$ Zellen
Boden	26	$\times 10^{28}$ Zellen
Terrestr. <i>subsurfaces</i>	25-255	$\times 10^{28}$ Zellen
Total	415 - 640 $\times 10^{28}$ Zellen	

Wissen: Mikrobielle Ökologie

Neue Biokatalysatoren

Systematik



Phylogenetic tree of life

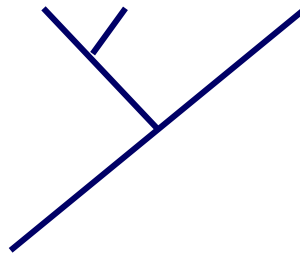


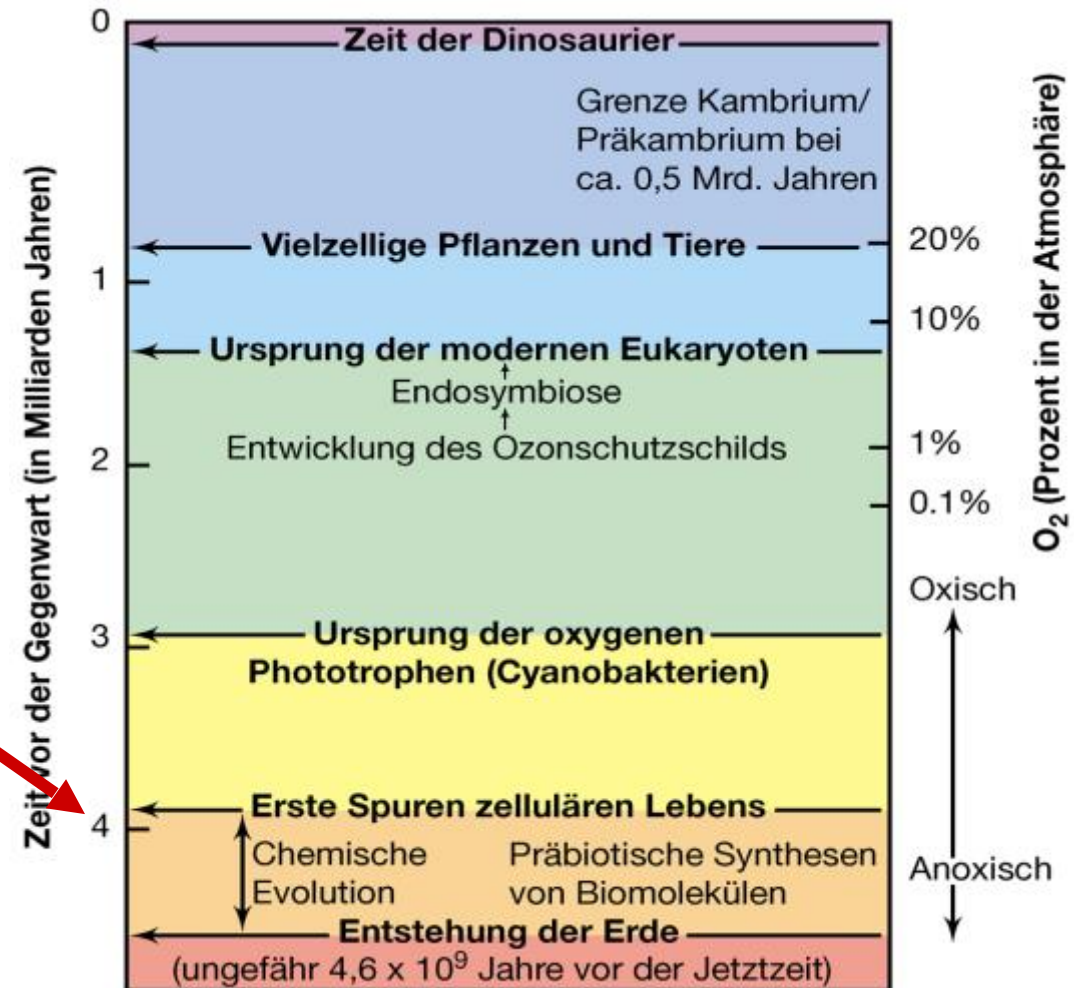
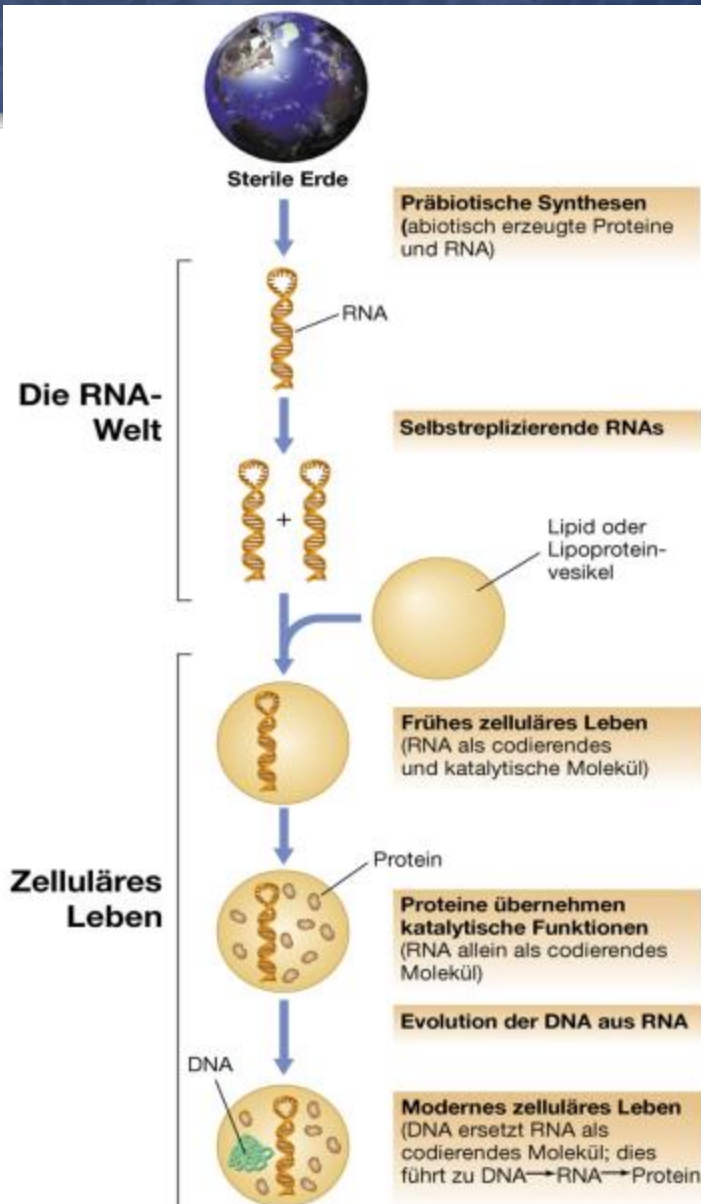
Carl R. Woese († 2012)

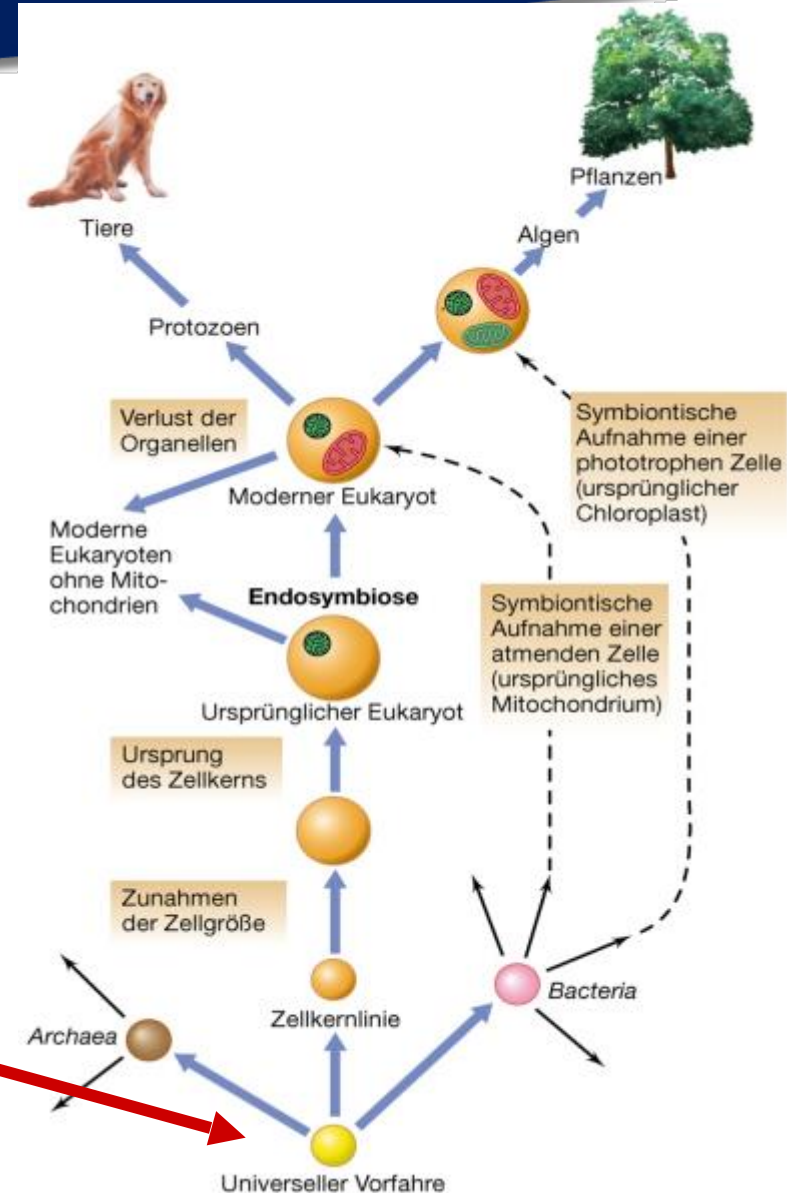
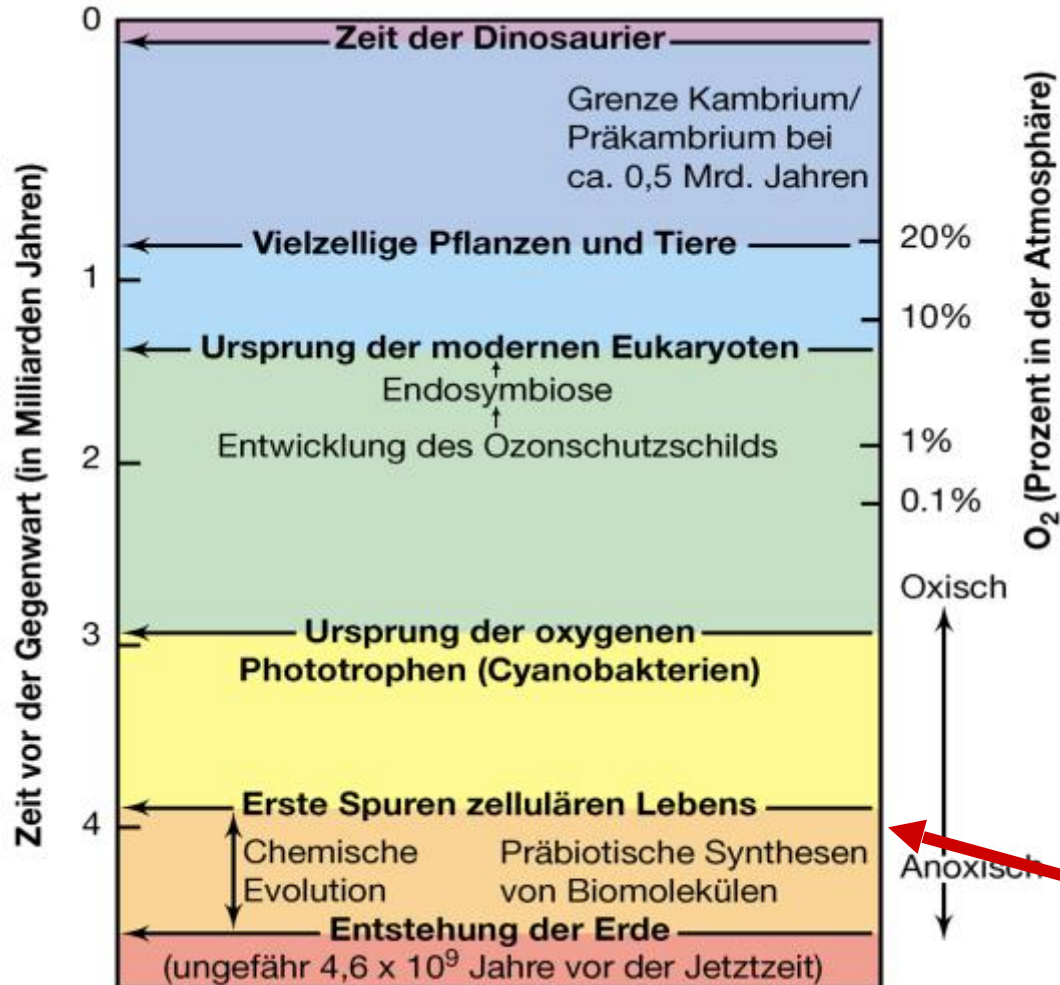
**Norm Pace
Dave Stahl**

16S rRNA

Seit 1980







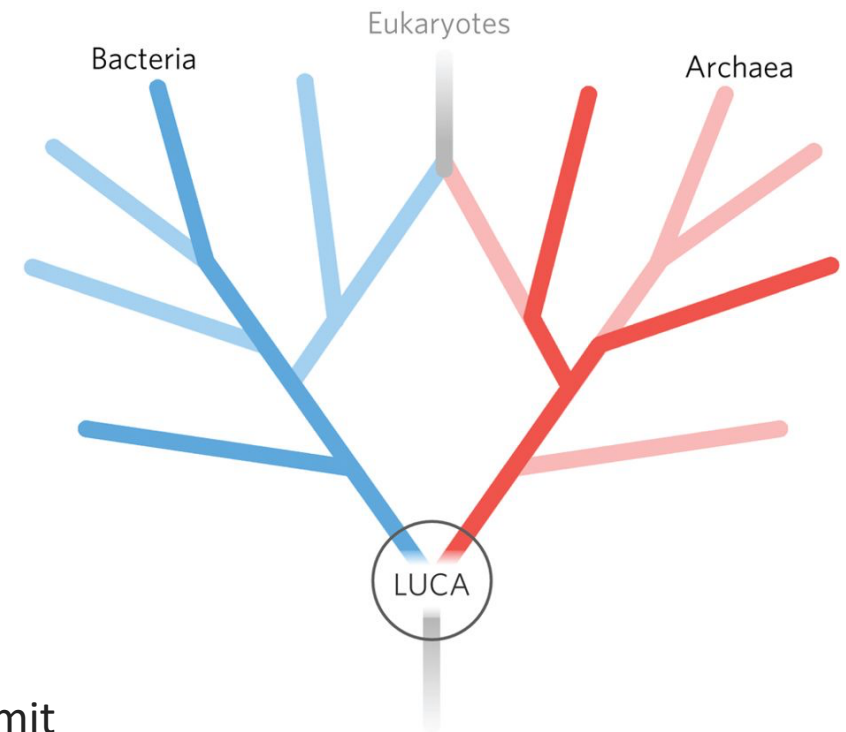


William F. Martin says that the Last Universal Common Ancestor can be traced back to deep sea vents like this one off the Galápagos.

Universal History Archive/UiG, via Getty Images

LUCA ist der Vorgänger der Archaea und Bacteria. Vermutlich ist es ein Organismus, den man als methanogenen bezeichnen würde, der H_2 und CO_2 benötigt, autotroph und thermophil ist. CO_2 wurde mit dem Wood–Ljungdahl Pathway fixiert.

Last universal common ancestor
aller Zellen
(LUCA, oder Progenote)



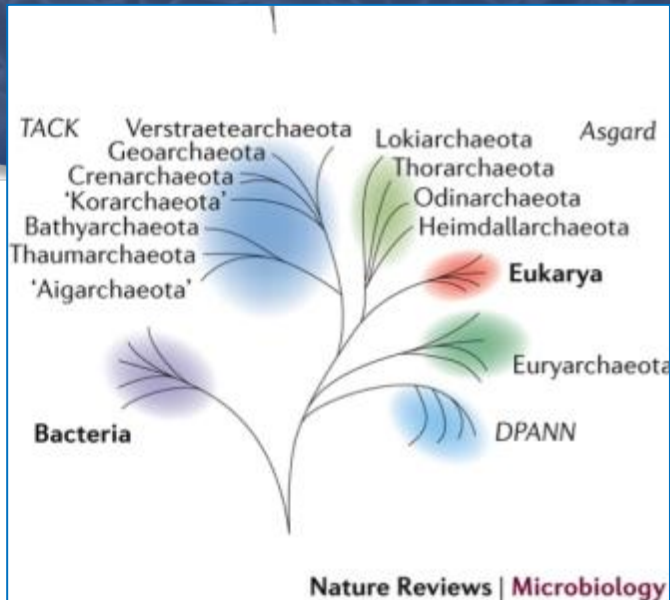
Nature Microbiology **volume 1**, Article number: 16116 (2016)



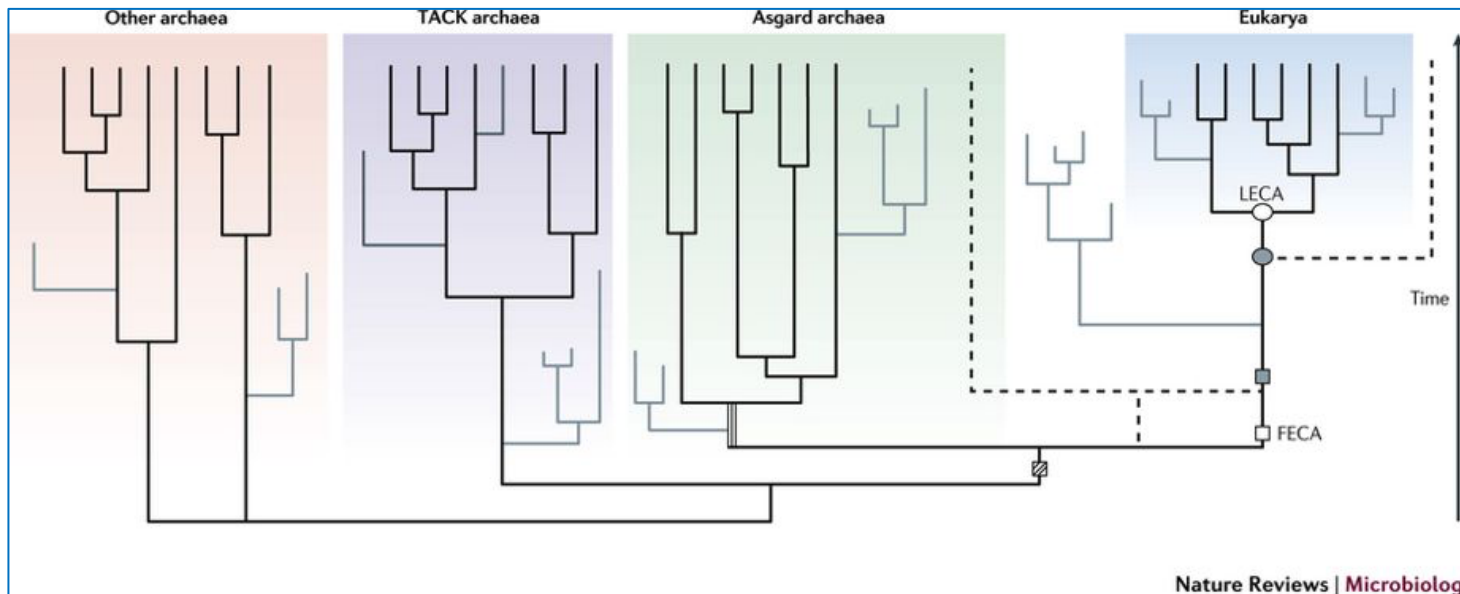
William F. Martin says that the Last Universal Common Ancestor can be traced back to deep sea vents like this one off the Galápagos.

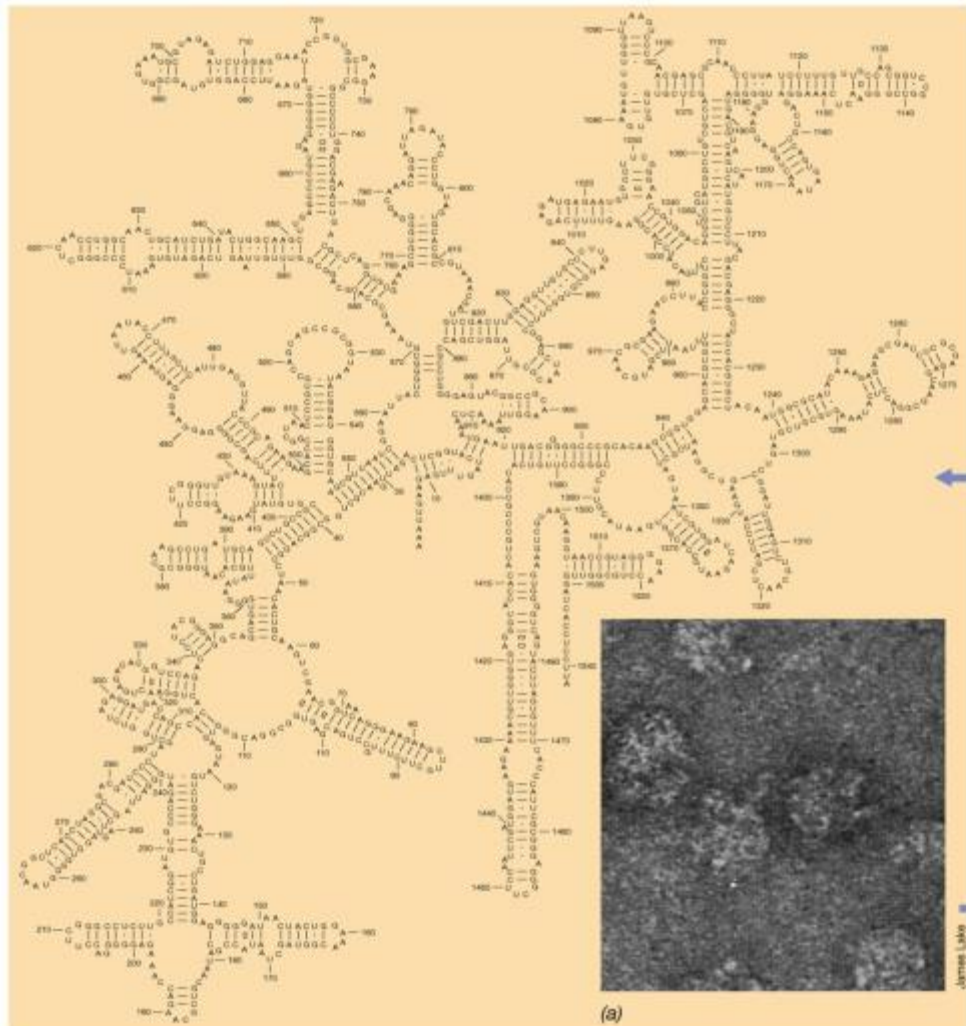
LUCA ist der Vorgänger der Archaea und Bacteria.

Vermutlich ist es ein Organismus, den man als methanogenen bezeichnen würde, der H_2 und CO_2 benötigt, autotroph und thermophil ist. CO_2 wurde mit dem Wood–Ljungdahl Pathway fixiert.



Phylogenomische Analysen deuten darauf hin, dass die Eukarya aus den Archea hervorgegangen sind und zwar aus dem Superphylum der Asgard Archaea





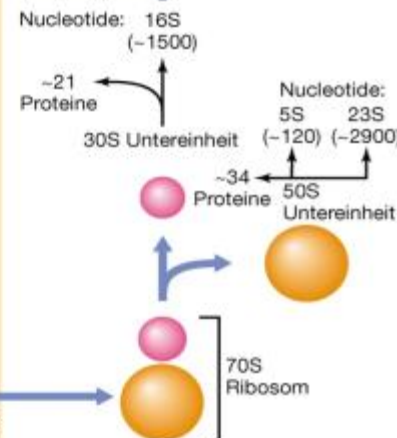
16S rRNA-Sequenz

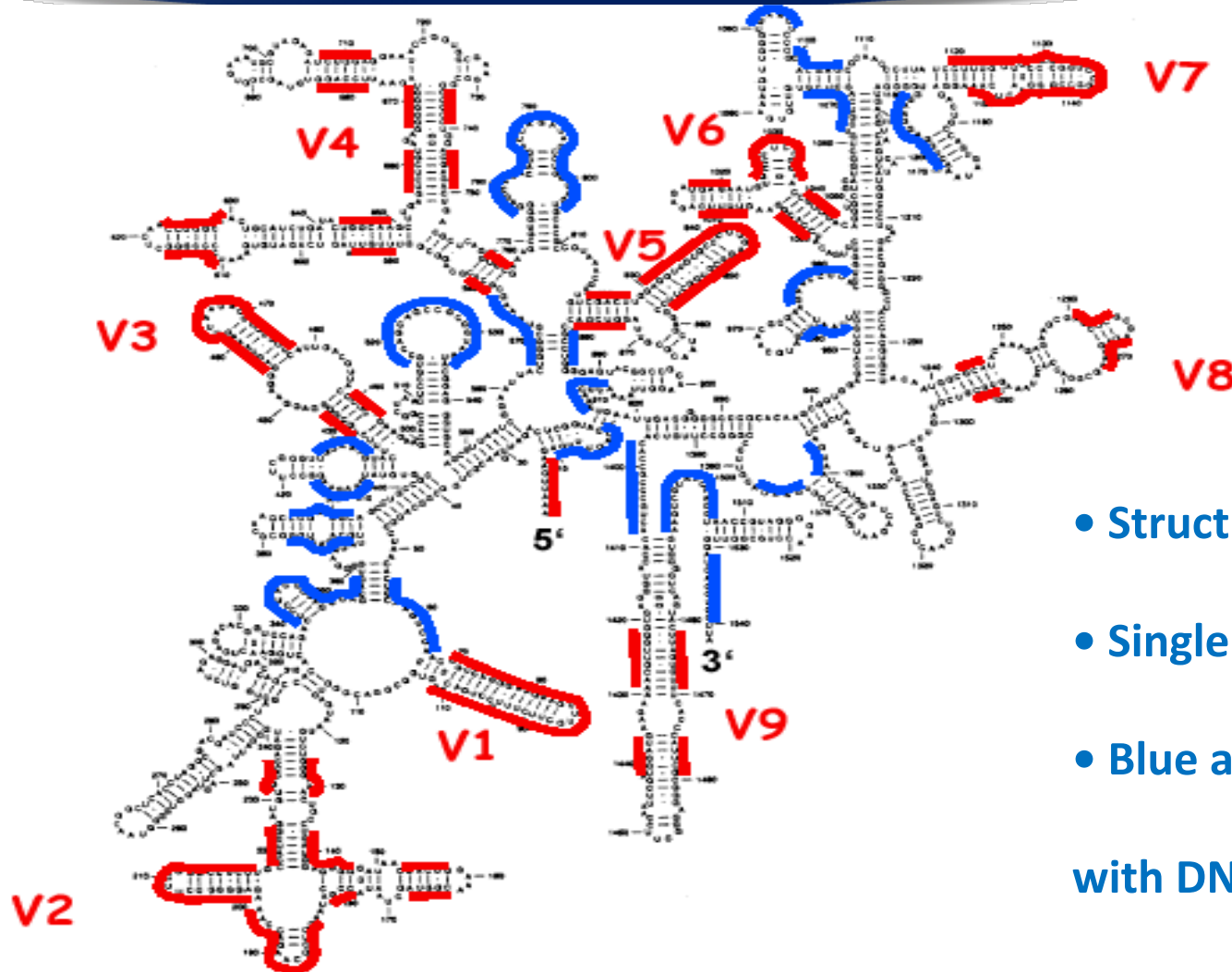
Grundlage für die meisten Stammbäume

Elektronenmikroskopische Aufnahme von 70S Ribosomen von *Escherichia coli*

(b) Teile des Ribosoms

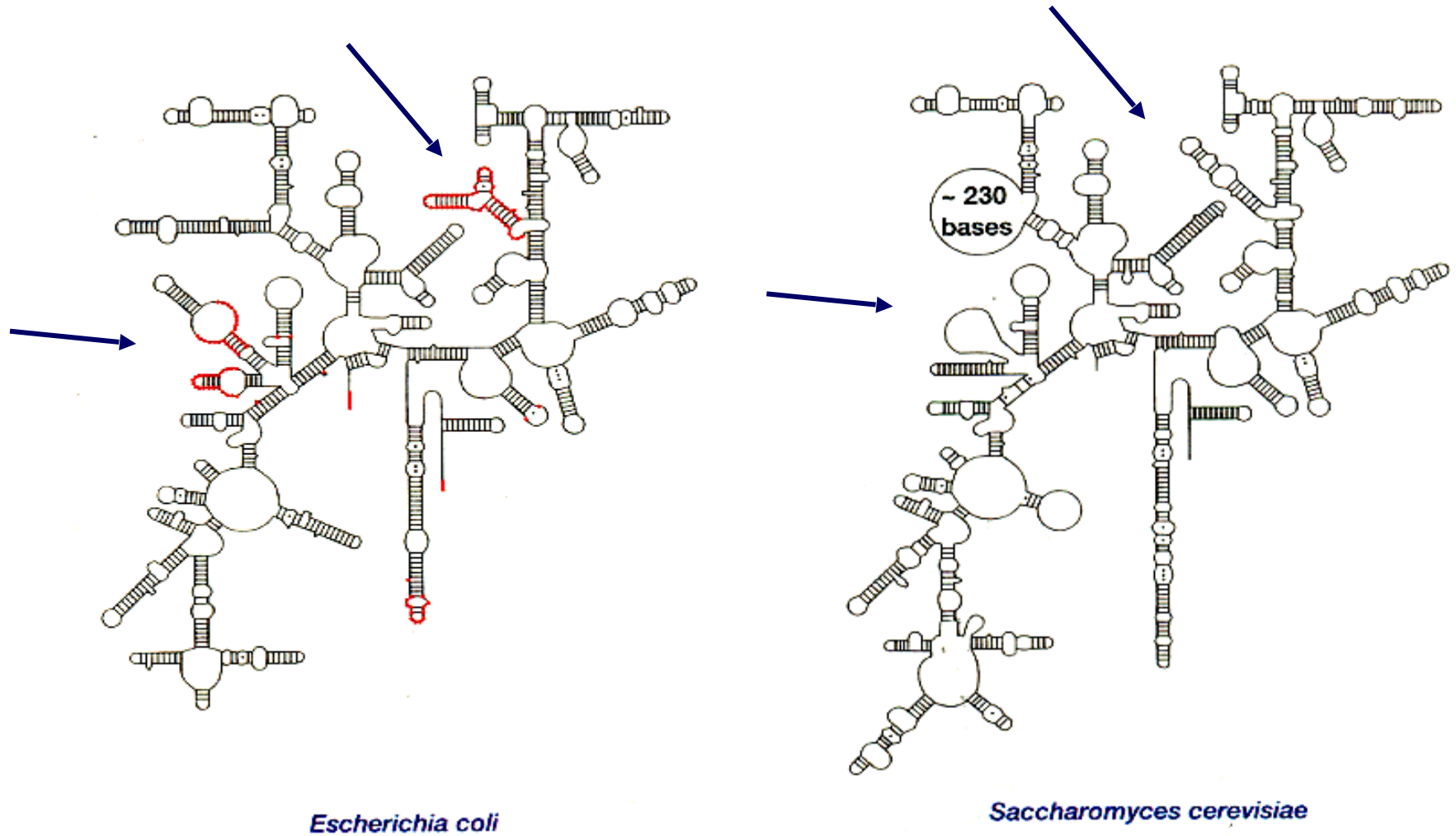
5S, 16S und 23S beziehen sich auf verschiedene Formen von RNA in den Untereinheiten des Ribosoms





16S rRNA
(1500 b)

- Structural component of ribosome
- Single stranded molecule
- Blue areas are single stranded and available for hybridisation with DNA probes – FISH

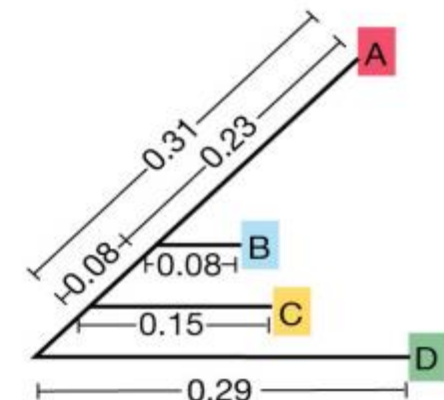


Organism	Sequence	Analysis
A	CGUAGACCUGAC	For A → B, three differences occur out of a total of twelve; thus $\frac{3}{12} = 0.25$
B	CCUAGAGCUGGC	
C	CCAAGACGUGGC	
D	GCUAGAUGUGCC	

(a) Sequence alignment and analysis

Evolutionary distance	Corrected evolutionary distance
E_D A → B 0.25	0.30
E_D A → C 0.33	0.44
E_D A → D 0.42	0.61
E_D B → C 0.25	0.30
E_D B → D 0.33	0.44
E_D C → D 0.33	0.44

(b) Calculation of evolutionary distance



(c) Phylogenetic tree

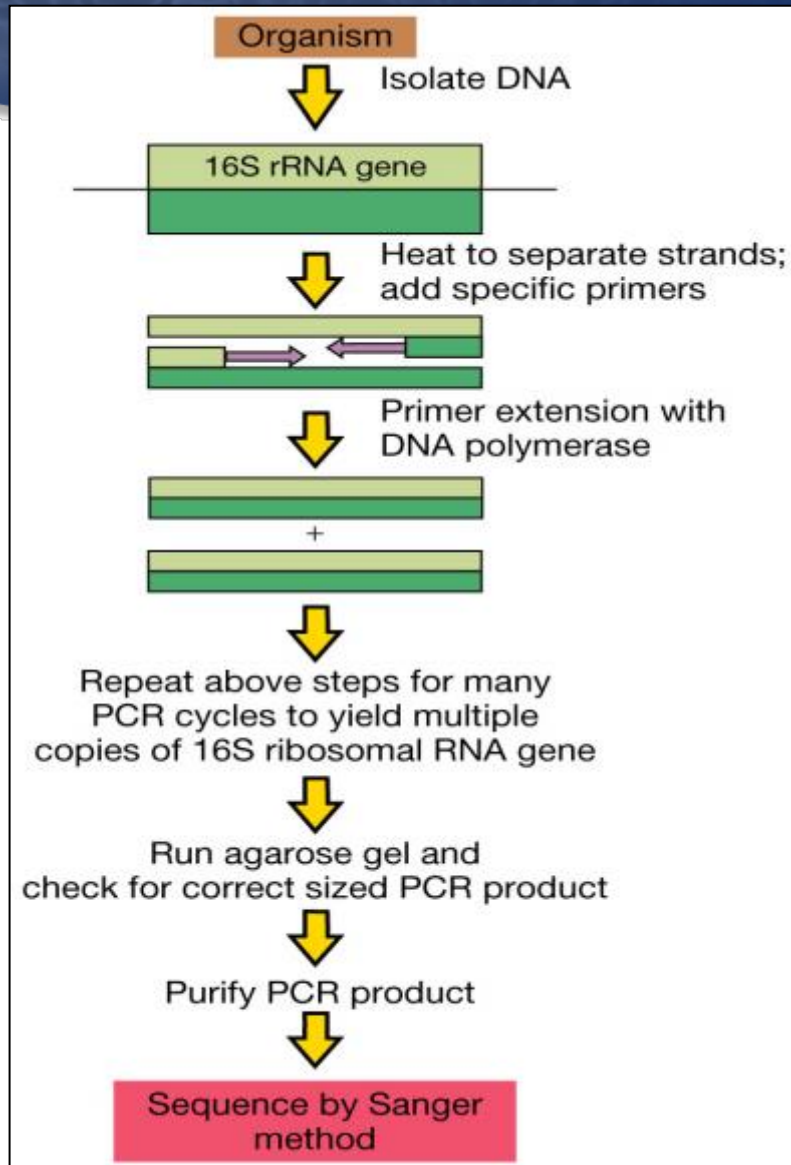
16S rRNA

- ← ca. 1500 Ribonukleotide
- ← Sekundärstrukturen, extensive Basenpaarung
- ← Hoch konserviert bei allen Organismen
- ← Altes Molekül, konstante Funktion, moderat gut konserviert

←← Signatursequenz

Charakteristisch und spezifisch für eine phylogenetische Gruppe,
Sequenzähnlichkeit weist auf phylogenetische Verwandtschaft hin

- ← Ausmaß der Ähnlichkeit in diesen Sequenzen zwischen 2 Organismen
zeigen die rel. evolutionäre Verwandtschaft auf



Konstruktion eines Stammbaums und phylogenetischer Nachweis

mit Hilfe der **16S rRNA-Gene**



Phylogenetische
Stammbäume
werden anhand von
DNA-Sequenzvergleichen
erstellt

<http://rdp.cme.msu.edu/>

```
1 ggcggtgagc ttaacacatg caagtcgaac ggaaaggccc ttcgggtact cgagtggcga 61
acgggtgagt aacacgtggg tgatctgccc tgcacttttg gataagcctg ggaaactggg 121
tctaataccg aatatgaccg cgcacttcct ggtgtgtggg ggaaagcttt tgcgggtgtg 181
gatgggcccc cgccctatca gcttgttggg ggggtaatgg cctaccaagg cgacgacggg 241
tagccggcct gagaggggtg ccggccacac tgggactgag atacggccca gactcctacg 301
ggaggcagca gtggggaata ttgcacaatg ggcgcaagcc tgatgcagcg acgccgcgtg 361
agggatgacg gccttcgggt tgtaaacctc tttcaatagg gacgaagcgc aagtgacggg 421
acctatagaa gaaggaccgg ccaactacgt gccagcagcc gcggtaatac gtaggggtccg 481
agcgttggtc ggaattactg ggcgtaaaga gctcgtaggg ggtttgtcgc gttgttcgtg 541
aaaactcaca gcttaactgt gggcgtgcgg gcgatacggg cagactagag tactgcaggg 601
gagactggaa ttcctggtgt agcgggtggaa tgcgcagata tcaggaggaa caccgggtggc 661
gaaggcgggt ctctgggcag taactgacgc tgaggagcga aagcgtgggg agcgaacagg 721
attagatacc ctggtagtcc acgncgtaaa cgggtgggtac taggtgtggg tttccttcct 781
tgggatccgt gccgtagcta acgcattaag taccgccctt ggggagtagc gccgcaaggc 841
taaaactcaa agaaattgac gggggncgcg acaagcggcg gagcatgtgg attaattcga 901
tgcaacgcga agaaccttac ctgggtttga catgcacagg acgccagtag agatattggt 961
tcccttggtg cctgtgtgca ggtggtgcat ggctgtcgtc agctcgtgtc gtgagatggt 1021
gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atcttatggt gccagcgcgt aatggcgggg 1081
actcgtgaga gactgccggg gtcaactcgg aggaagggtg ggatgacgtc aagtcatcat 1141
gccccttatg tccagggtct cacacatgct acaatggccg gtacaaaggg ctgcgatgcc 1201
gtgaggtgga gcgaatcctt tcaaagccgg tctcagttcg gatcggggtc tgcaactcga 1261
ccccgtgaag tcggagtcgc tagtaatcgc agatcagcaa cgctgcgggtg aatacgttcc 1321
cgggccttgt acacaccgcc cgtcacgtca tgaaagtcgg taacacccca agccgggtggc 1381
ctaacccttg tggagggagc cgtcgaaggt gggatcggcg attgggacga agtcgtaaca 1441
aggtagccg
```

Die zukünftige Benennung von Mikroorganismen erfolgt anhand des
International Code of Nomenclature of Prokaryotes

Jeder Organismus hat einen unigen Identifier, der bei der NCB geführt und bei Erstellung des Genoms generiert wird

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/167>

Derzeit liegen etwa 30.000 Namen vor, die oft leider nur wenig Bezug zur wirklichen phylogenetischen Einordnung der Organismen haben!

Derzeit gilt die **Approved Lists of Bacterial Names**

Dabei gilt:

Domäne

Klasse (Phylum)

Ordnung

Familie

Gattung

Art (Unterart)

z.B. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

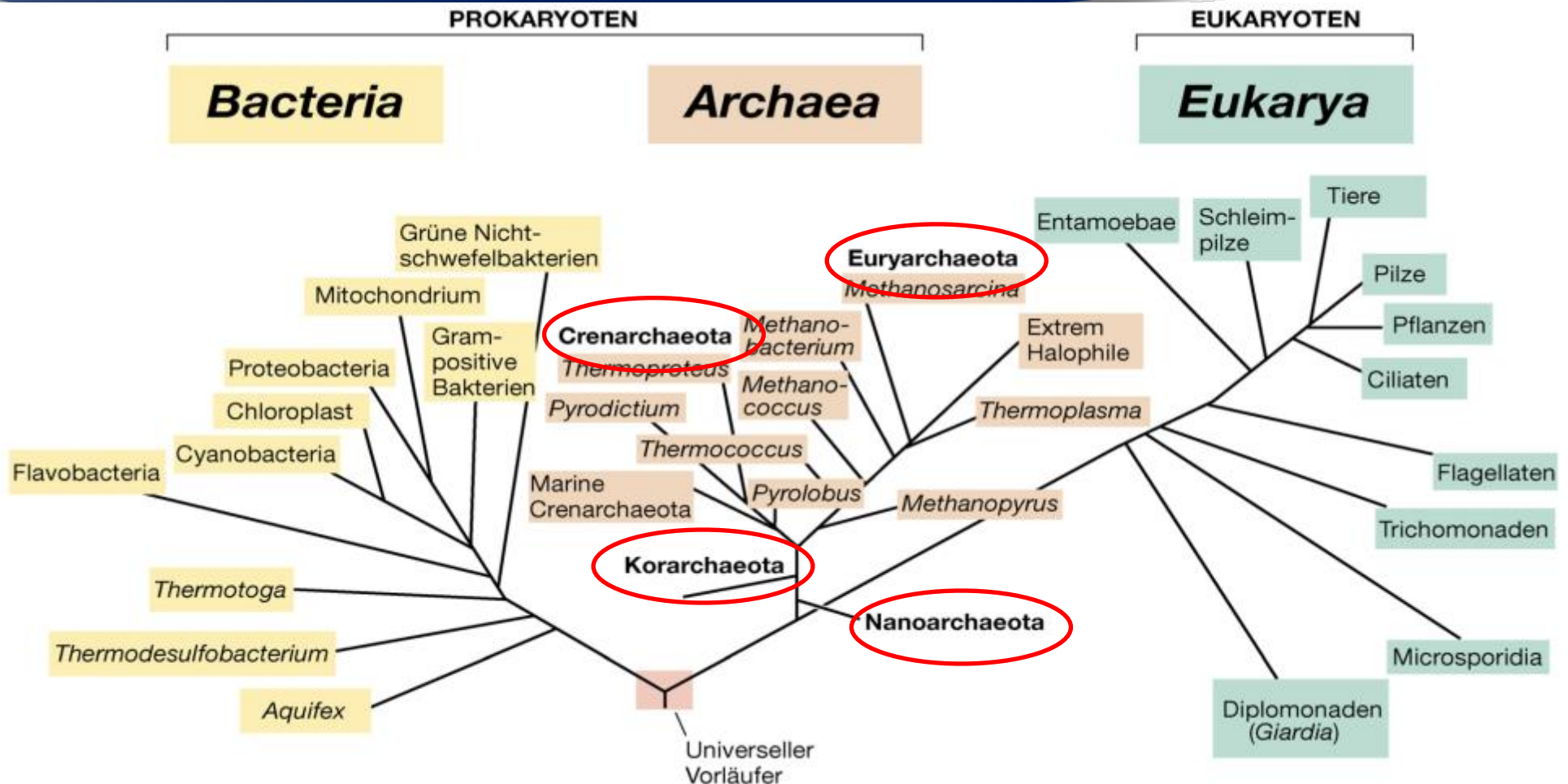
Merke: *Artnamen* immer (!!!) kursiv schreiben.

und es gehört immer beides ‚Gattung und Art‘ zur Speziesbeschreibung

ggfls. Subspezies und die Stammnummer aus der Datenbank/zentralen Stammsammlung

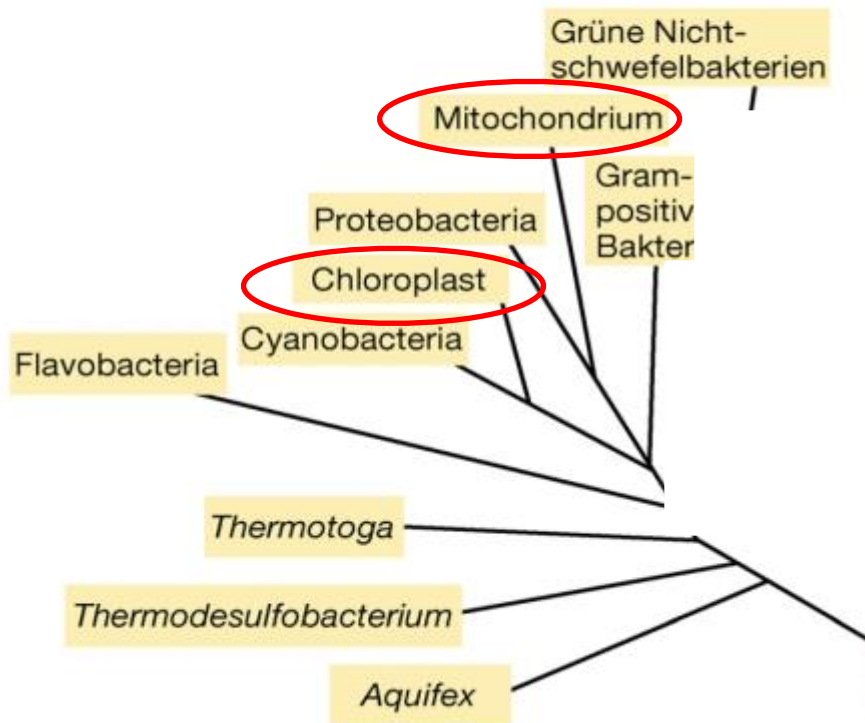
Stammsammlung:

z.B. DSMZ, **D**eutsche **S**ammlung für **M**ikroorganismen und **Z**ellkulturen
oder ATCC, **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection

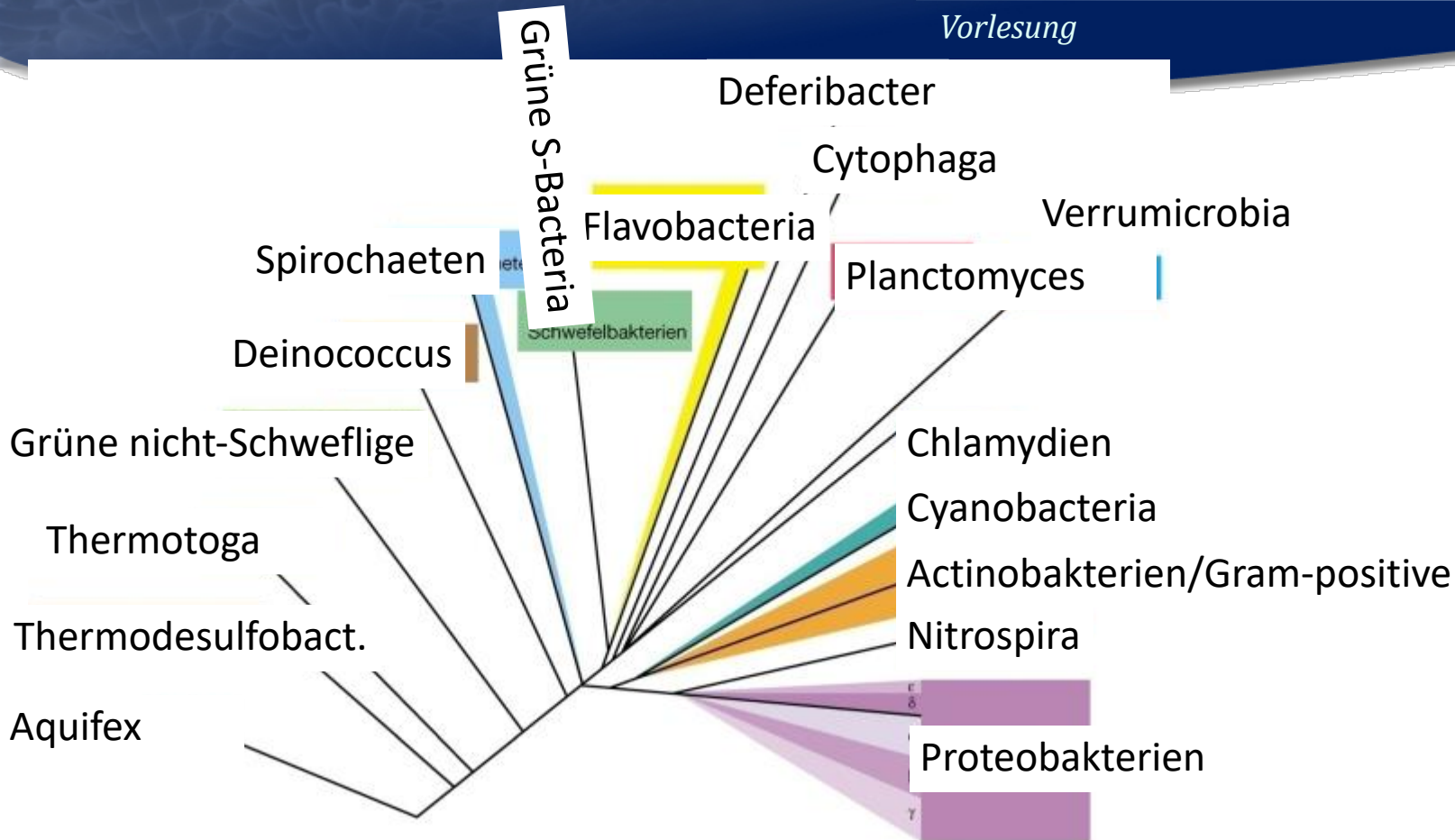


Universeller phylogenetischer Baum, der durch die vergleichende ribosomale RNA-Sequenzierung aufgestellt wurde

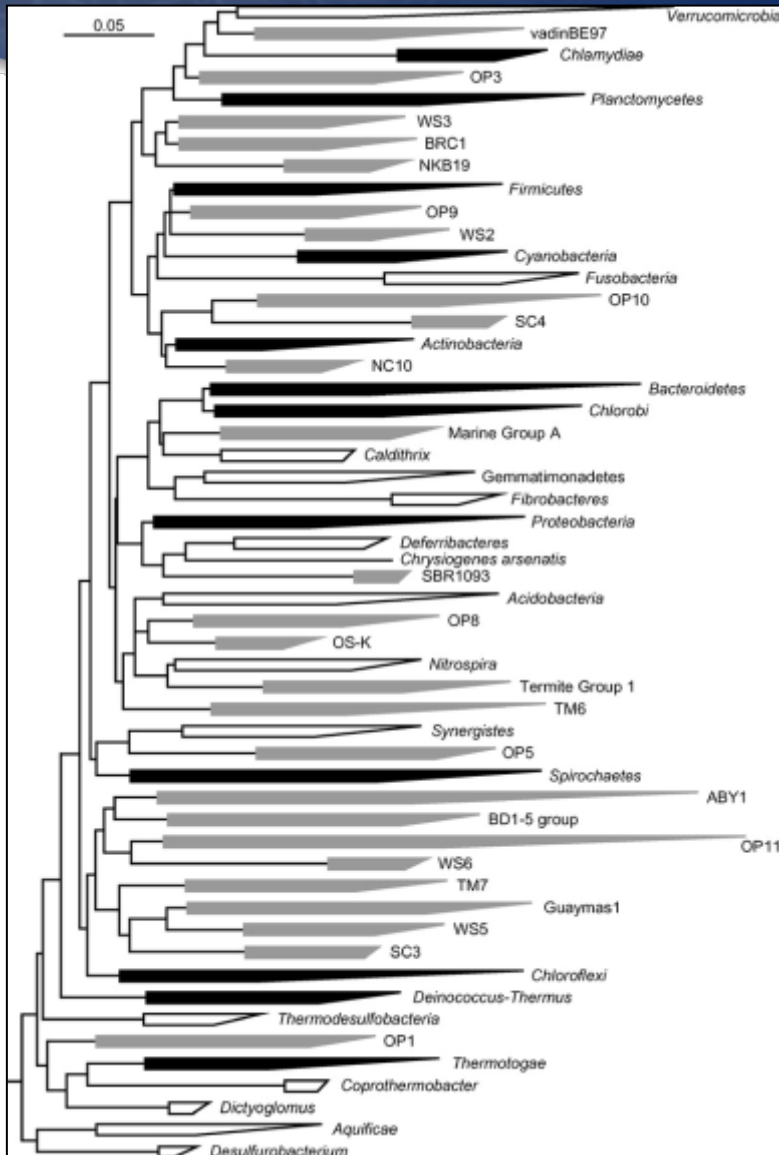
Bacteria



**Mitochondrien und Chloroplasten
sind bakteriellen Ursprungs!**



derzeit etwa 92 verschiedene
Gruppen (Phyla) bei den **Bacteria** und 26 bei den **Archaea**



Derzeit gibt es ca. 92 bakterielle Phyla-Äste im Stammbaum

Nur ca. 30 davon sind gut kultivierbar!

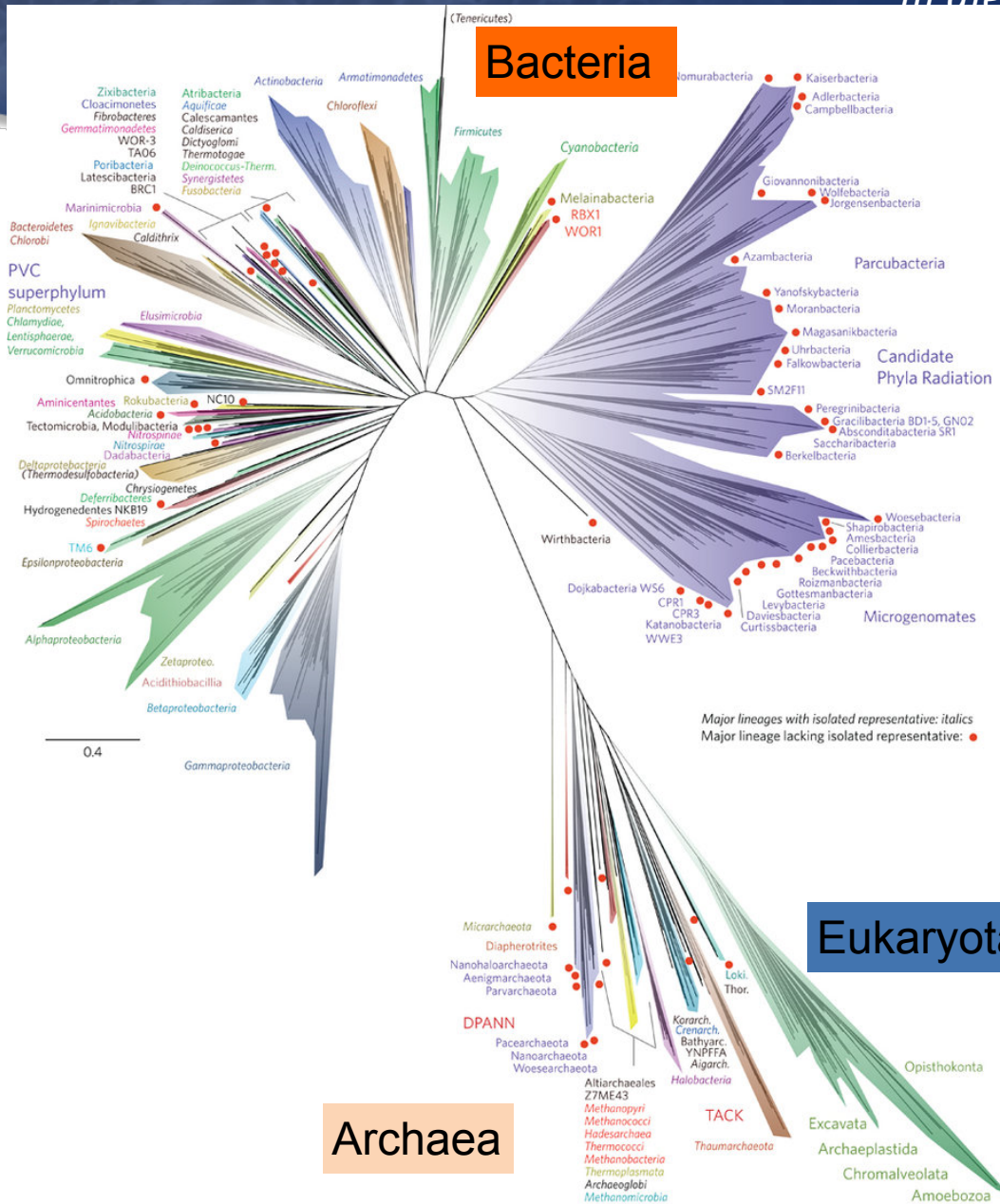


weiss und schwarz: kultivierbar

weiss seit 1984 neu dazugekommen

Grau: nicht/kaum kultivierbar

Michael S. Rappé and Stephen J. Giovannoni, **THE UNCULTURED MICROBIAL MAJORITY** Annual Review of Microbiology, 2003 Vol. 57: 369-394



92 bakterielle und
26 archaelle Phyla

● Keine isolierten Vertreter
vorhanden



Ansatz



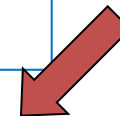
Extraktion von DNA



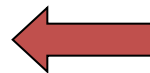
PCR mit universellen
archaeellen / bakteriellen
16S rRNA Primern



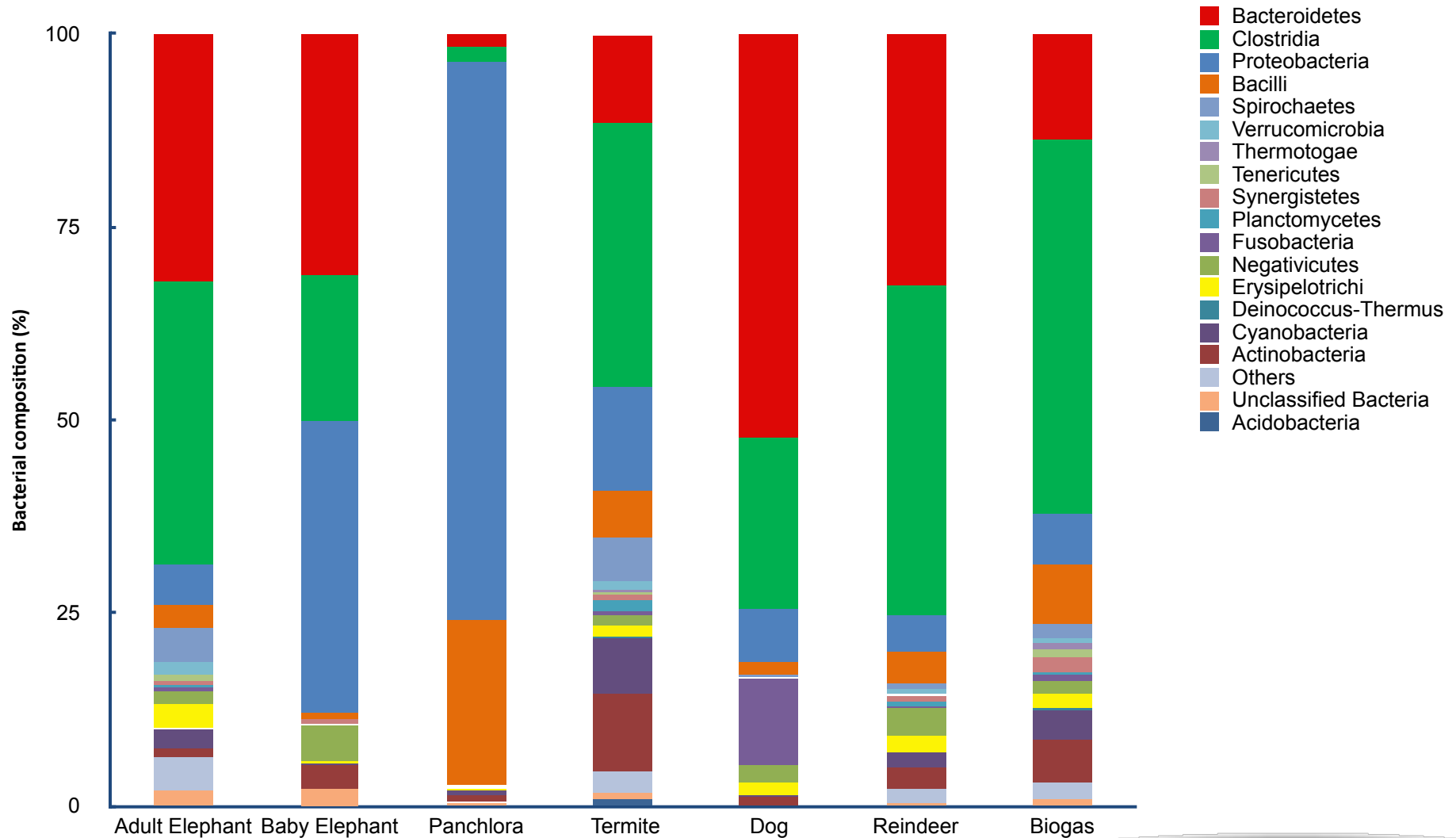
Amplicon-
Sequenzuierung oder
Klonierung in *E. coli*



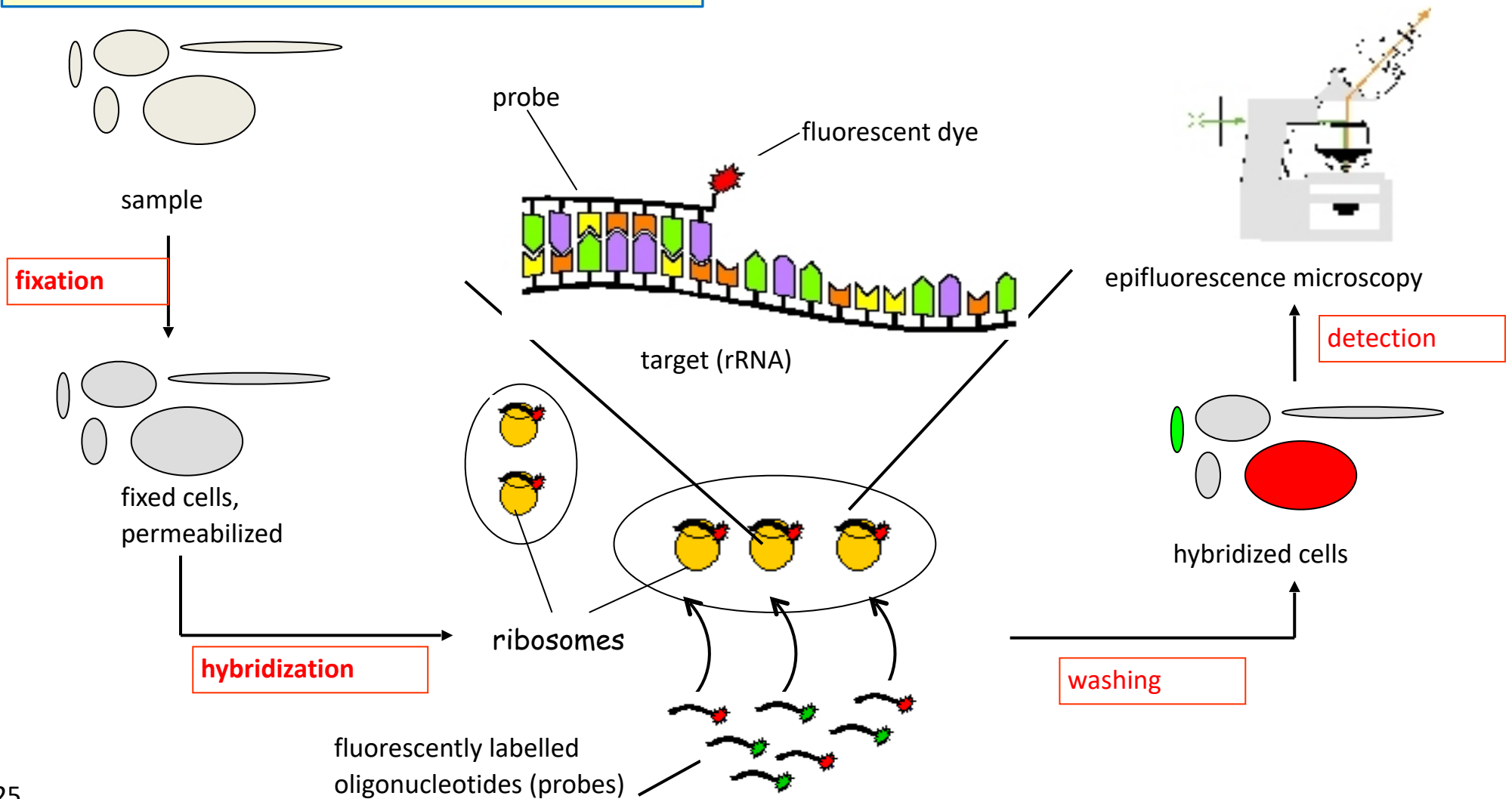
Sequenzierung der Klone



Phylogenetische Analyse

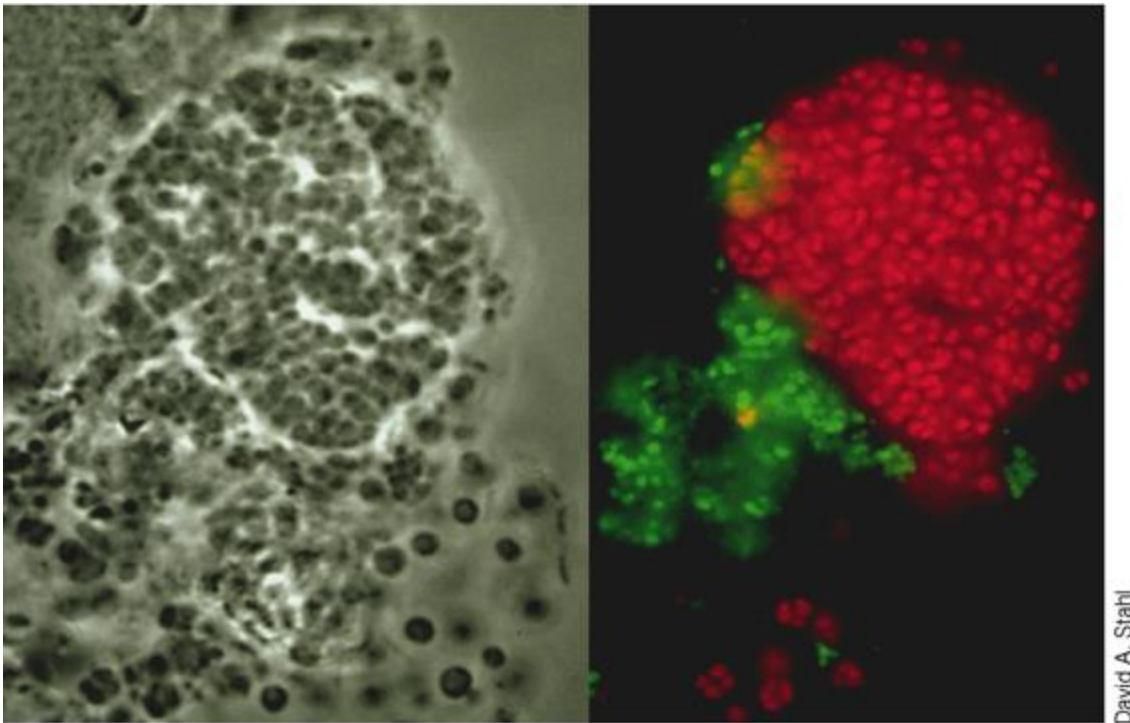


Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH)



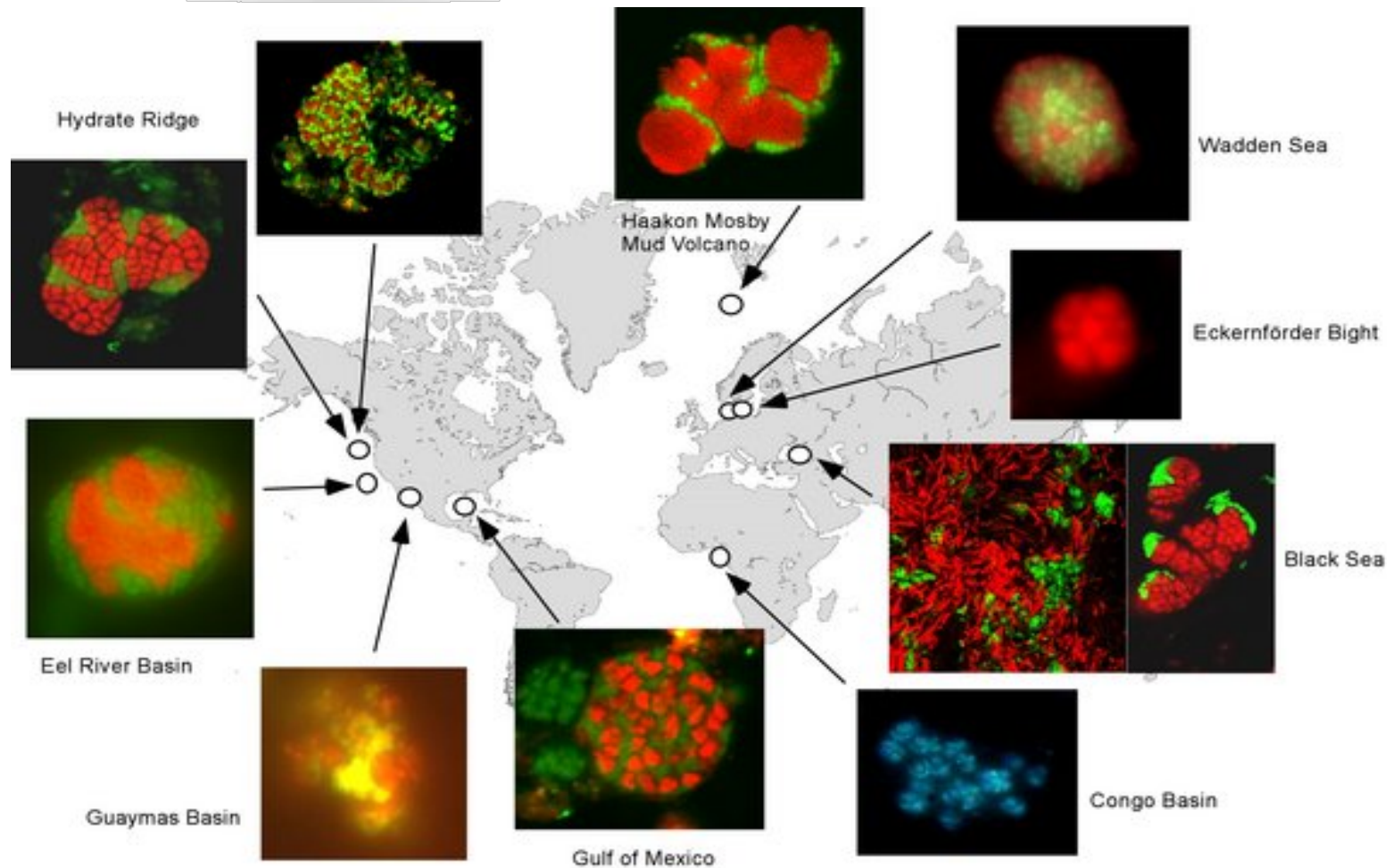
Anwendung phylogenetischer Färbungen, um nitrifizierende Bakterien in einem Partikel aktivierten Klärschlamms sichtbar zu machen

Die rot fluoreszierende Sonde ist für eine Signatursequenz in der 16S rRNA **ammoniakoxidierender Bakterien** spezifisch, während die grün fluoreszierende Sonde spezifisch für eine Sequenz ist, die nur in **nitritoxidierenden** Bakterien vorkommt

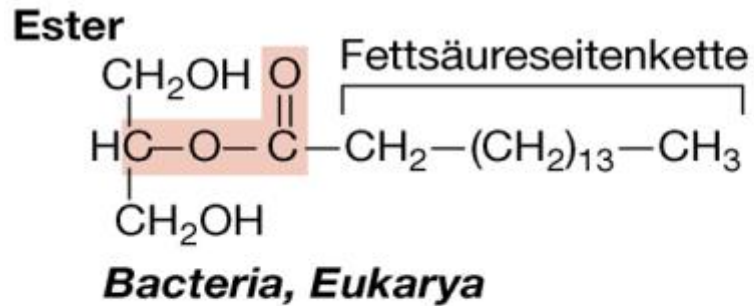


Links:
Phasenmikroskopische
Aufnahme

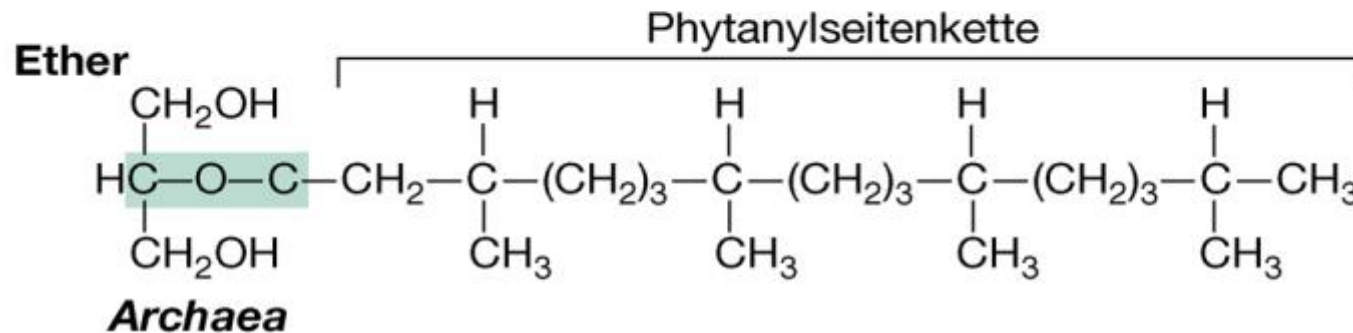
Rechts:
Mikroskopische Farbaufnahme des
gleichen Gesichtsfelds nach
Durchführung
einer phylogenetischen Färbung



Parameter zur Differenzierung zwischen
Bacteria, **Archaea** und **Eukarya**



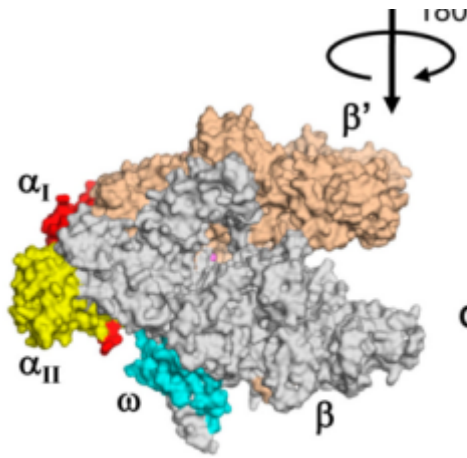
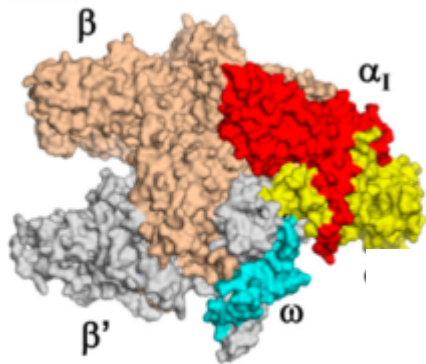
Lipide bei **Bacteria**, **Eukarya**
und **Archaea**



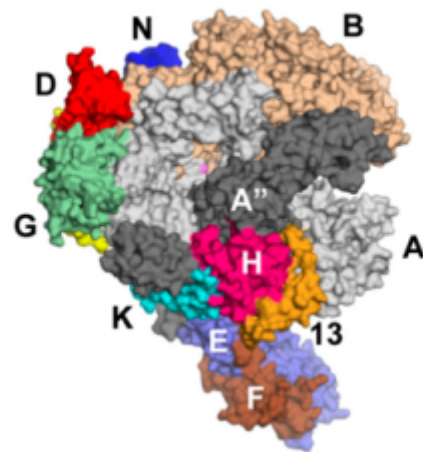
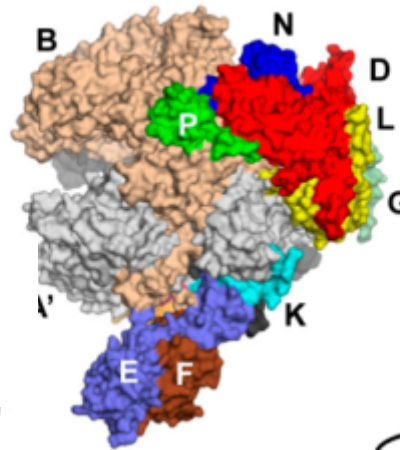
Bei den **Bacteria** und den **Eukarya** enthalten die Lipide Fettsäuren (dargestellt ist Palmitinsäure), die durch Esterverknüpfung an Glycerin gebunden sind

Bei den **Archaea** bestehen die Seitenketten aus verzweigten Kohlenwasserstoffen (dargestellt ist Phytanyl, C₂₀), die durch Etherverknüpfungen an Glycerin gebunden sind. Phytanyl wird aus Isopren synthetisiert

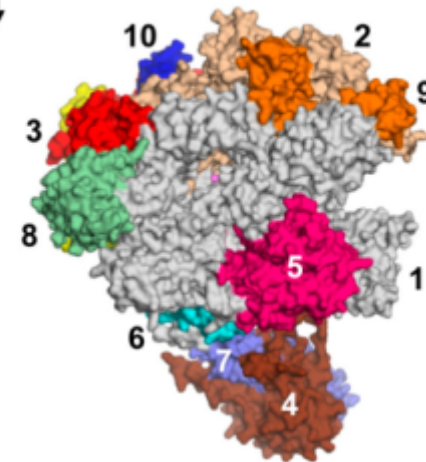
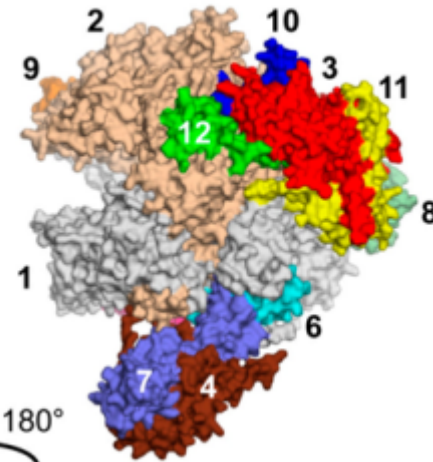
Bacteria



Archaea



Eukarya (RNAPII)



Hirata et al., 2009

Eukarya <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Archaea <i>Pyrococcus furiosus</i>	Bacteria <i>Escherichia coli</i>
RNA Pol. II		
RPB1		β'
RPB2	rpoB	β
	rpoA1	
		- 127,0
		- 103,1
RPB3	rpoA2	
		- 44,4
RPB4	rpoD	$\alpha \times 2$
		- 29,7
RPB5		
RPB6	rpoE1	
		- 21,7
RPB7		
RPB8	rpoF	
		- 14,0
RPB9		
RPB11	rpoL	
		- 11,1
RPB10		
RPB12	rpoH	
		- 9,2
	rpoN	
		- 8,2
	rpoK	
		- 6,2
	rpoP	ω
		- 5,7

Parameter zur Differenzierung zwischen
Bacteria, Archaea und Eukarya

RNA-Polymerasen aus Vertretern der drei
Domänen:

Das Bandenmuster nach Trennung der
Untereinheiten durch Elektrophorese in
einem Polyacrylamidgel ist schematisch
dargestellt

Homologe Untereinheiten sind mit der
gleichen Farbe unterlegt

Fundamentale Unterschiede zwischen den drei Domänen des Lebens:

	Bacteria	Archaea	Eukarya
Prokaryot. Zellstruktur	+	+	-
RNA-Polymerase	1 /5-6 UE	Mehrere/8-12UE	3/12-14 UE
Histone	-	+/- (ähnliche)	+
Zellwand (Murein)	+	+	-
DNA im Zellkern	-	-	+
Circuläre/Lineare Chromosomen	Circulär	circuläre	Linear
Genome	0.5- ca 13 Mbp	0.5-5 Mbp	13 Mbp bis ca. 30 Gbp
Gene	Wenige hundert bis ca 13.000	Wenige hundert bis ca 5.000	Mindestens einige tausend bis ca. 30.0000
Ribosomen	70S	70S	80S
Membranlipide	+ (Esterbindung)	+ (Etherbindung)	+ (Esterbindung)
Introns	-	-	+
Operons	+	+	-
Promotor	-10 und – 35, Pribnow- Box	TATA-Box	TATA-Box